

INPADOC書誌・リーガルステータス表示

■INPADOC書誌情報

文献番号 WO 200061114 A1

出願番号 2000JP 200002272

出願日 2000年 4月 7日

優先権 JP 1999 101020 A (1999年 4月 8日)

発行日 2000年10月19日

タイトル [ENG] FINE PARTICLES TARGETING CELLS AND PROCESS FOR
PRODUCING THE SAME
[FRE] PARTICULES FINES CIBLANT DES CELLULES, ET PROCEDE DE
PRODUCTION CORRESPONDANT

出願人 MITSUBISHI CHEM CORP (JP); TAGAWA TOSHIAKI (JP); NIKI HISAE (JP);
SAISHO TOMOKO (JP); MARUYAMA KAZUO (JP)

発明者 TAGAWA TOSHIAKI (JP); NIKI HISAE (JP); SAISHO TOMOKO (JP);
MARUYAMA KAZUO (JP)

IPC第7版 A 61K 9/127 A; A 61P 35/00 B

他分類 [ECLA] A61K9/107D; A61K9/127; A61K47/48W8

指定国 AU CA CN JP KR US [AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LU MC NL PT SE]

要約 Fine particles wherein a ligand capable of binding to target cells is directly or
indirectly bonded to another ligand capable of being incorporated into the cells. These
fine particles are usable in delivering drugs, etc.

L'invention concerne des fines particules dans lesquelles un ligand capable de se lier à
des cellules cibles est directement ou indirectement lié à un autre ligand pouvant être
incorporé dans lesdites cellules. Ces particules fines sont notamment utilisées pour
l'administration de médicaments, etc.

BEST AVAILABLE COPY

■INPADOCリーガルステータス

2000年10月19日 AK + DESIGNATED STATES
(A1) AU CA CN JP KR US

2000年10月19日 AL + DESIGNATED COUNTRIES FOR REGIONAL PATENTS
(A1) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT
SE

2000年11月16日 DFPE REQUEST FOR PRELIMINARY EXAMINATION FILED PRIOR TO
EXPIRATION OF 19TH MONTH FROM PRIORITY DATE (PCT
APPLICATION FILED BEFORE 20040101)

2000年12月13日 121 EP: THE EPO HAS BEEN INFORMED BY WIPO THAT EP WAS
DESIGNATED IN THIS APPLICATION

2001年10月 3日 ENP ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE IN:
JP 2000 610447 (A) (File)

2002年 5月29日 122 - EP: PCT APP. NOT ENT. EUROP. PHASE

(19) 日本国特許庁 (J P)

再公表特許 (A 1)

(11) 国際公開番号

W O 0 0 / 6 1 1 1 4

発行日 平成14年7月16日 (2002. 7. 16)

(43) 国際公開日 平成12年10月19日 (2000. 10. 19)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/127

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

出願番号 特願2000-610447(P2000-610447)
(21) 国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 2 2 7 2
(22) 国際出願日 平成12年4月7日 (2000. 4. 7)
(31) 優先権主張番号 特願平11-101020
(32) 優先日 平成11年4月8日 (1999. 4. 8)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, C N, J P, K R, U S

(71) 出願人 三菱化学株式会社
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(72) 発明者 田川 俊明
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000
番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所
内
(72) 発明者 二木 寿枝
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000
番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所
内
(74) 代理人 弁理士 高柳 昌生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞をターゲティングする微粒子及びその製造方法

(57) 【要約】

ターゲット細胞に結合性を有するリガンドとその細胞に取り込まれる機能を有するリガンドを直接または間接的に結合させた微粒子であって、医薬品運搬等に用いることが出来る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特定の細胞をターゲティングする微粒子であって、該細胞に結合性を有するリガンド及び該細胞に取り込まれる機能を有するリガンドの 2 種のリガンドを有する事の特徴とする微粒子。

【請求項 2】 微粒子が、ミセルまたはリボソームであることを特徴とする請求項 1 に記載の微粒子。

【請求項 3】 細胞に結合性を有するリガンドが、抗体または抗体フラグメントであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の微粒子。

【請求項 4】 細胞に取り込まれる機能を有するリガンドが、タンパク質、抗体、増殖因子、トランスフェリン、糖質、ホルモン、または低分子化合物であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 5】 該微粒子に水溶性高分子が結合していることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 6】 該細胞に結合性を有するリガンドが水溶性高分子を介して該微粒子に結合していることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 7】 該細胞に結合性を有するリガンドが水溶性高分子を介して微粒子に結合し、更に該微粒子に水溶性高分子が結合していることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 8】 細胞が腫瘍細胞である請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 9】 微粒子内に抗腫瘍剤が封入されている請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の微粒子。

【請求項 10】 ターゲット細胞に結合性を有するリガンドを水溶性高分子を介して結合し、さらに、該細胞に取り込まれる機能を有するリガンド及び水溶性高分子を結合した特定の細胞をターゲティングする微粒子の製造方法であって、あらかじめターゲット細胞に結合性を有するリガンドと水溶性高分子の複合体を製造し、この複合体、該細胞に取り込まれる機能を有するリガンド、及び水溶性高分子を該微粒子に結合させることを特徴とする微粒子の製造方法。

【請求項 11】 該微粒子がリボソームであることを特徴とする請求項 10 に記載の微粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】**技術分野**

本発明は、蛋白質、ペプチド、糖質、ホルモン、低分子化合物等のリガンドを結合することで機能性を付与した微粒子及びその製造方法に関する。本発明で得られる微粒子は、医薬品運搬体、診断、検査等に用いることができる。

背景技術

極性基を有する脂質や両親媒性ポリマー等は、脂質ミセル、高分子ミセル、リポソーム等の小胞を、またオイル成分と共に用いることでマイクロエマルジョン等の微粒子を形成する。これらの微粒子を薬剤や核酸等のキャリアーとして利用する試みが近年多くなされてきている。

特にリポソームでは脂質相に脂溶性物質を、内部水相に水溶性物質を封入でき、薬剤等の低分子化合物のみならず蛋白質、核酸などのDDS用キャリアーとして数多くの研究がなされている。

近年、標的細胞に効率よく薬効成分をデリバリーすることの重要性が指摘されており、その為リポソーム表面に抗体、糖鎖などのリガンドを結合したリポソームが研究されている。例えば癌胎児性抗原に対する抗体を結合したリポソーム等が挙げられる。

また、細胞表面への結合に加えて、細胞内部にまでリポソームを送達する目的で、インターナライズするリガンドをリポソームに結合したり、内在化されることが確認された抗原に対する抗体等を用いたリポソームが用いられてきた。

例えば癌細胞に対するターゲティングを例にすると、抗Her2抗体結合リポソーム (Cancer Lett. 118 (2) (1997) 153)、抗トランスフェリンレセプター抗体結合リポソーム (Br J Cancer. 76 (1) (1997) 83)、トランスフェリン結合リポソーム (日本臨床56 (3) (1998) 105) 等が研究されている。

これらのリポソームは標的細胞に結合するだけでなく、効率的に細胞内に取り込まれることで、より効率的な薬効が期待される。特に封入物質が細胞内に送達されて始めて効果を発揮するもの例えば、遺伝子導入による治療を目的とした場合等はこのような細胞内デリバリーが重要となる。

しかしながら細胞への標的特異性とインターナライズする両特性を兼ね備えたリガンドを検索することは容易ではなく、リガンドとして使用できるものも限られたものであった。

つまり、例えば、癌胎児性抗原に対する抗体をリボソーム化した場合、癌細胞への選択性や発現量が高くターゲットとしては良好なものを選択できるが、そのような抗体は必ずしも細胞内へ取り込まれない。またトランスフェリンやトランスフェリンに対する抗体を用いた場合、細胞へのインターナライズが期待されるが、トランスフェリンは限られた癌細胞のみの高発現であること、また多くの正常細胞にも多少は発現していることから実際に適用できる対象は限られたものであった。

発明の開示

上記の問題点を解決する為、本発明者らは研究を進めた結果、微粒子上にターゲット細胞に結合性のリガンドに加えターゲット細胞への取り込み活性のあるリガンドを付加することにより微粒子を細胞内に輸送することを見いだした。

驚くべきことに細胞への取り込み活性のあるリガンドだけでは極めて取り込み能の低いターゲット細胞においても、両者のリガンドを付与することで高い細胞内取り込みが見いだされた。

即ち、本発明の要旨は、特定の細胞をターゲティングする微粒子であって、その微粒子に該細胞に結合性を有するリガンド及び該細胞に取り込まれる機能を有するリガンドの2種のリガンドを有する事を特徴とする微粒子に存する。

本発明の好ましい態様としては、該細胞に結合性を有するリガンドが水溶性高分子を介して該微粒子に結合している微粒子であって、特に好ましい態様としては、該細胞に結合性を有するリガンドが水溶性高分子を介して微粒子に結合し、更に該微粒子に水溶性高分子が結合している微粒子である。

さらに本発明の別の要旨は、ターゲット細胞に結合性を有するリガンドを水溶性高分子を介して結合し、さらに、該細胞に取り込まれる機能を有するリガンド及び水溶性高分子を結合した特定の細胞をターゲティングする微粒子の製造方法であって、あらかじめターゲット細胞に結合性を有するリガンドと水溶性高分子の複合体を製造しておき、この複合体、細胞に取り込まれる機能を有するリガ

ド、水溶性高分子を各々微粒子に結合させることを特徴とする微粒子の製造方法に存する。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、微粒子とは分子中に親水性部分及び疎水性部分を含む両親媒性分子の会合によって得られるミセル、高分子ミセル、マイクロスフェア、エマルジョン、リボソーム、リボソームなどの二分子膜小胞体を重合して得られる高分子ベシクル等が挙げられるが、好ましくはミセルである。

このようなミセルは、両親媒性物質から構成される小球、楕円体または長い円筒形の形態を取りうる。例えば、リボソーム、novasome、非界面活性剤ベシクルを包含するものであるが、さらに好適に用いられるのはリボソームである。

ミセルを構成する両親媒性分子は親水性部分及び疎水性部分を含み、それ自体既知の通常用いられる方法によりミセルを形成し得るものであれば如何なるものであってもよく、それらの中で好適な両親媒性物質としては脂質を挙げることができる。

本発明に係るミセルを構成し得る脂質としては、例えば天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン等）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（DMPC）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（DOPE）等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質、リン脂質、コレステロール、脂肪酸等のポリエチレングリコール誘導体等を挙げることができる。これらの脂質は単独または二種以上、あるいはこれらとコレステロール等の非極性物質と組み合わせ用いられる。さらにステアリルアミン、ジセチルフォスフェート、DC-Cholなどの荷電性物質、マレイミド基を有するリン脂質誘導体（特開平6-157559号公報）やPEG先端にマレイミド基を有するリン脂質誘導体（特開平6-220070号公報）等を含んでも良い。また、融合リボソームとして知られるリボソームとセンダイウイルスを融合したリボソームのごとく

ウイルスの一部あるいは全部を組み込んだものであっても良い。

ミセル、リポソームはいかなる方法で作製したものでも良いが、自体既知の通常用いられる製造技術を用いて製造できる。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え機械的震とうを加え形成するマルチラメラリポソーム (MLV) や、超音波処理、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニラメラリポソーム (SUV)、界面活性剤除去法、逆相蒸発法 (リポソーム 砂本ら 南江堂 1988)、MLVを均一ポア径を有するメンブランを加圧して押し出すエクストルージョン法等から得られるラージユニラメラリポソーム (LUV) を用いることができる (Liposome Technology, Vol. 1 2nd edition)。

さらに本発明の別の微粒子の形態として、遺伝子とポリペプチドからなる複合体、遺伝子とポリペプチドと脂質からなる複合体、あるいは遺伝子とポリペプチドとリポソームからなる複合体を用いることができる。

本発明において細胞に結合性を有するリガンド (A) とは、細胞表面に存在するターゲット分子に結合性を有し、且つ、実質的にターゲットとする細胞へは取り込まれることのないものであり、具体的には、細胞表面に存在する抗原に対する抗体、EGF、VEGF、HGF等の蛋白質、葉酸、レクチン、糖鎖、ビタミン等から選択されるが、好ましくは抗体である。ヒトに治療に用いる場合、ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体がより好ましく用いられる。抗体はその全体を用いてもよく、またペプシン処理等によって得られるF (a b')₂ 抗体等の抗体フラグメント、s c F v等の抗体部分を含むペプチドを用いても良い。

リガンド (A) は共有結合を介して微粒子と結合することができる。この結合はいかなる既知のリガンド結合法を用いても良くカルボジイミド法、マレイミド法、過ヨウ素酸法、等を用いることができる。

リポソーム、ミセル等に組み込む場合はリガンド (A) に脂質を導入しその部分を介して導入する方法 (PNAS 87 (1990) 5744) 等を用いても良い。

また、リガンド (A) にチオール基等の活性基を導入し、他方リポソーム等の微粒子にマレイミド基、ピリジジルスルフィド基等の基を導入後、両者を反応す

ることで固定化する方法（特開平4-346918号公報、特開昭58-134032号公報、Cancer Res. 47 4471（1987））等を用いることもできる。

リガンド（A）は直接微粒子に結合させるか、スペーサー部分を介して微粒子に結合させるか、又は、その両タイプの結合によるもの、のいずれでもよいが、通常、実質的に全てのリガンドがスペーサーを介して結合したものが好ましい。このスペーサーとしては、通常、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアミノ酸、ポリ乳酸、ポリグリセリン、ポリグリコール酸、多糖類、または、ポリアルキレングリコールの誘導体等の水溶性高分子が代表的に挙げられるが、好ましくはポリアルキレングリコール、特に、ポリエチレングリコール（PEG）誘導体である。リガンド（A）を水溶性高分子を介して微粒子に結合させることにより、細胞に結合性を有するリガンド（A）の標的細胞への結合性を十分に保持できる。

スペーサー部分を介して結合する方法としては、例えば、特開平6-126152号公報、特開平6-220070号公報、BBA1239（1995）133等に記載される方法を用いることができる。特に好ましくは特開平11-152234号に示されるPEG誘導体を用いた方法である。スペーサーの分子量は500から50000程度が用いられるが、好ましくは1000から10000程度であり、より好ましくは2000から6000程度である。

リガンド（A）は、微粒子の脂質重量の0.1%から20%（W/W）を結合することができる。好ましくは0.5から10%であり、より好ましくは1から5%である。

本発明でターゲット細胞への取り込み活性のあるリガンド（B）とは、ターゲットとする細胞へ取り込まれる機能を有するものであれば如何なるものでも良いが、EGFレセプター、トランスフェリンレセプター、HGFレセプター等に対する抗体、その抗体フラグメント、その一部を含むペプチド等の抗体由来物質、トランスフェリン、EGF、HGF、FGF、TGF等の蛋白質、マンノース糖の糖、LPS等の複合糖質、LDL等の脂質、葉酸等の低分子化合物（好ましくは分子量400程度）、エストロジェン、ガストリン、メラノサイト刺激ホルモ

ン等のホルモン、EGF、HGF、FGF、インシュリン等の増殖因子等が挙げられるが、好ましくは抗体由来物質あるいはトランスフェリンであり、更に好ましくはトランスフェリンである。

リガンド(B)は上述リガンド(A)と同様にして微粒子に結合することができるが、スペーサーを介することなく直接微粒子に結合することが好ましい。

リガンド(B)は、微粒子の脂質重量の0.1%から20%(W/W)を結合することができ、好ましくは0.5から10%であり、より好ましくは1から5%である。

微粒子にはリガンドに加えて水溶性高分子(C)を結合させることができる。この水溶性高分子(C)としては、前記スペーサーとして用いられる水溶性高分子と同様に、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアミノ酸、ポリ乳酸、ポリグリセリン、ポリグリコール酸、多糖類、ポリアルキレングリコールの誘導体等の水溶性高分子が挙げられるが、好ましくはポリアルキレングリコール、特に、ポリエチレングリコール(PEG)誘導体である。水溶性高分子(C)は前記スペーサーとして用いる水溶性高分子と同一種類の高分子でも異なる種類の高分子でもよい。ただし、スペーサーとして用いる水溶性高分子はリガンド及び微粒子の両方に結合性を有する機能が必要なのに対し、水溶性高分子(C)はリガンドと結合性を有さないことが必要である。微粒子にリガンド(A)を水溶性高分子を介して結合させると微粒子リガンド複合体を効率よく標的細胞に結合することができる効果があるが、リガンドと結合性を有さない水溶性高分子(C)を微粒子に結合させることにより、細胞に取り込まれる機能を有するリガンド(B)の非特異的結合を低減するという効果が生じ、生体内での安定性の改善が期待される。

水溶性高分子(C)の分子量は500から50000程度が用いられるが、好ましくは1000から10000程度であり、より好ましくは2000から6000程度である。

この水溶性高分子(C)は、リガンドを微粒子に結合後導入することも、またリガンドと同時に導入することもできる。例えば、微粒子としてリボソームを用いる場合、特開平4-346918号公報に開示されているようにマレイミド基

を導入したリボソームにチオール基を導入したリガンドを結合後、さらにチオール基を有するポリアルキレン部分を含む化合物（PEG誘導体）を結合することでリガンドとPEGを付与することができる。また、リガンドの脂質誘導体及び、PEGの脂質誘導体を同時に用い界面活性剤除去法によりリボソームを形成することでリガンドとPEGを付与したリボソームを作製することもできる。

微粒子に水溶性高分子を介して細胞に結合性を有するリガンド（A）を結合させ、かつ、細胞に取り込まれる機能を有するリガンド（B）を結合させ、さらに、微粒子を水溶性高分子（C）で修飾する場合は、あらかじめリガンド（A）と水溶性高分子の複合体を製造しておき、この複合体、リガンド（B）、及び水溶性高分子（C）を各々微粒子に結合させることが好ましい。また、このリガンド（A）と水溶性高分子の複合体、リガンド（B）、及び水溶性高分子（C）を微粒子に結合させる場合は、前記複合体の高分子部分、リガンド（B）、及び水溶性高分子（C）に微粒子と結合し得る官能基を導入した後、これらと微粒子を反応させることが好ましい。特に、微粒子がリボソームである場合に、この方法が好ましい。

水溶性高分子（C）は微粒子の脂質重量に対して2から100%、好ましくは3から50%、より好ましくは5から10%で用いることができる。

本発明の微粒子中には、通常、医薬品又は診断用薬剤を包含することが望ましいが、この微粒子に導入できる医薬品としては、例えば、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、5-FU等の抗腫瘍剤、チモール等のアドレナリン遮断薬、クロニジン等の高血圧剤、プロカイン等の制吐剤、クロロキニーネ等の抗マラリア剤、並びにその薬学的に許容しうる塩及び誘導体、リジンA鎖やジフテリアトキシン等の毒素蛋白質及びこれらをコードする遺伝子、k-ras等のアンチセンス、HSV-TKやP53、TNF、GM-CSF等をコードする遺伝子並びにその遺伝子とポリリジン等のポリカチオンとの複合体及び誘導体、ヨード、レニウム、イットリウム等の放射性同位元素、Sodium Borocaptate等の中性子捕捉療法用化合物が挙げられる。

微粒子に導入し得る診断用薬剤としては、例えば、ヨード、インジウム、テクネシウム等の放射性同位元素、ガドリニウム等の造影剤、ユーロビウム

等の蛍光体等が挙げられる。

これら医薬品及び診断用薬剤の微粒子への導入は、それ自体既知の通常用いられる方法で行うことができる。例えば、リポソームである場合は、リポソーム形成時に水溶液として添加して封入しても良く、またリポソーム形成後ベシクル内外にpH勾配等の濃度勾配を形成させ、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤を取り込ませる方法 (Cancer Res. 49 5922 (1989), BBA 455, 269 (1976)) を用いても良い。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例 1

50mMリン酸緩衝液 1mM EDTA (pH7.0) に溶解した抗CEAマウスモノクローナル抗体21B2 (IgG1F(ab')₂) 2.86mg/ml 2.15ml 6.1mgに特開平11-152234号記載のPEG誘導体 (Ac-S-PEG-Suc) 30mg/ml 37μLを添加した。特開平11-152234号記載のPEG誘導体 (Ac-S-PEG-Suc) は、以下の方法で合成した。

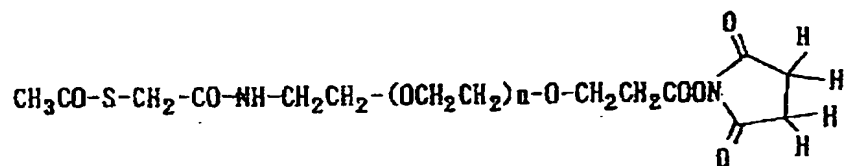
<Ac-S-PEG-Sucの製造方法>

塩化メチレン10mlに溶解したポリ (エチレングリコール) -ビス-ω-アミノ-α-カルボキシル (PEG平均分子量3400, Shearwater polymers, Inc) 1gにS-アセチルチオグリコール酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Sigma社) 74.8mg及びトリエチルアミン41μlを添加した。攪拌し溶解後、さらに10mgのS-アセチルチオグリコール酸N-ヒドロキシスクシンイミドを添加し室温で3.5時間攪拌し反応した。反応進行はTLC (クロロホルム/メタノール=85/15、ヨース発色、以下TLCは同様の条件で行った) で添加したポリ (エチレングリコール) -ビス-ω-アミノ-α-カルボキシルの低Rfのスポットが高Rf (約0.6) にシフトすることで確認した。

窒素下に溶媒を留去した反応物にクロロホルム10mlを添加し溶解した。ク

クロロホルムで膨潤した *sep-pak* (SILICA PLUS Waters 社) に添加しクロロホルム/メタノール (4/1 (v/v)) で溶出することでサンプルを前処理した。再び窒素下に溶媒を留去しクロロホルムに溶解後、シリカゲルカラム (ローバーカラム LiChroprep Si60 25×310 mm 関東化学) に添加した。クロロホルムで洗浄後、クロロホルム/メタノール (85/15 (v/v)) で展開溶離し TLC の R_f が約 0.6 の主生成物をブールし精製した。窒素下に溶媒を留去し 583 mg を得た。543 mg を約 2 ml の脱水した塩化メチレンに溶解しジエチルエーテルを加え沈殿化し濾取し真空ポンプで減圧乾燥した。脱水した塩化メチレン 5 ml に溶解したのち、N-ヒドロキシスクシンイミド (Sigma 社) 17.8 mg を加え 10 分間攪拌した。

さらに N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 31.9 mg を添加し窒素雰囲気下、攪拌しつつ室温で一晩反応した。沈殿物を濾別後、窒素下に溶媒を留去し少量の脱水塩化メチレンに溶解した。エチルエーテルを加え析出した沈殿を濾取し真空ポンプで減圧乾燥し TLC で単一な下記構造式の目的物 337 mg を取得した。¹H-NMR により目的物生成を確認した。



前述抗 CEA 抗体に本 PEG 誘導体を加え、25℃ で 1 時間反応後 0.1 M 酢酸 3.2 ml を添加した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4) で平衡化した SP セファロース (2 ml bed) に負荷し、同緩衝液で洗浄後、50 mM リン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 7.5) で溶出した。PD-10 カラムで緩衝液を 50 mM リン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 7.0) に交換した後、1/9 容量のヒドロキシルアミン溶液 (0.5 M ヒドロキシルアミン、0.5 M HEPES、25 mM EDTA、(pH 7.0)) を加え 25℃ 10 分間反応し脱アセチルすることでチオール基を付加した抗体を作製した。再度 PD-10 で緩衝液を 0.1 M リン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0) に交換し

リボソームへの結合に供した。

50 mMリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 7.0) に溶解したヒトトランスフェリン (シグマ社 5 mg/ml) に脱水メタノールに溶解したアセチルチオグリコール酸N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (シグマ社) 200 μ g を添加し 25℃ で1時間反応した後、50 mMリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 7.0) で平衡化したPD-10で脱塩した。ボイド部分に回収された修飾トランスフェリン溶液に1/9容のヒドロキシルアミン溶液 (0.5 Mヒドロキシルアミン、0.5 M HEPES、25 mM EDTA、(pH 7.0)) をを加え 25℃ 10分間反応し脱アセチルすることでチオール基を付加したトランスフェリンを作製した。再度PD-10で緩衝液を0.1 Mリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0) に交換しリボソームへの結合に供した。

リボソームはジバルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) /コレステロール/マレイミドカプロイルジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (特開平4-346918号公報) 18/10/0.5 (モル比) からなる混合脂質より作製した。すなわち、本混合脂質100 mgに10 mMカルボキシフルオレッセイン水溶液1 mlを加えて水和しマルチラメラリボソームを作製した。さらにextruder (Lipex Biomembranes) を用い0.1 μ mのポリカーボネートメンブランで整粒した。

得られたリボソームを0.1 Mリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0) で希釈し25 mg/ml (脂質濃度) 調整した。

上記リボソームに脂質重量の2%の、チオール基を付加した21B2抗体を添加し25℃で1時間反応した。さらに脂質重量の2%の、チオール基を付加したトランスフェリンを添加し25℃で1時間反応した。得られたリガンド結合リボソームを生食で平衡化したセファロースCL6B (ファルマシア社) カラムに負荷し、生食で展開することで精製した。抗体及びトランスフェリンの結合はSDS-PAGEで確認した。蛍光感度を増強する為にさらに退光にくい緑色蛍光色素PKH2 (ザイナシス社) でリボソームを標識し観察に用いた (21B2-TFリボソーム)。

対照として抗体に換えて0.1 Mリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0

0)を用いることでトランスフェリンのみを結合したリポソーム (TF-リポソーム)を作製した。また、トランスフェリンに換えて0.1Mリン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0)を用いることで抗体のみを結合したリポソーム (21B2リポソーム)を作製した。

ヒト胃癌細胞株MKN45 (TF受容体弱発現、CEA高発現:FACS scanで確認済み)を部分的にパイルアップするまで8ウェルチャンバースライド中で培養し、脂質濃度として1mg/mlの21B2-TF結合リポソーム、21B2リポソーム、TFリポソームとそれぞれ遮光下氷冷で1時間反応させた。反応終了後リポソーム液を洗浄除去し、10% (v/v) FBSを添加したメEDIUMに置換して37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、氷冷したPBS-Azで細胞を洗浄して風乾し、励起波長490nmにおける504nmの蛍光を観察した。

その結果、第2図に示すように、21B2リポソームを反応させた細胞では、細胞表面や外周に大部分の蛍光が観察されたのに対し、TFリポソームを反応させた細胞ではごく弱いながらも細胞内にリポソームの取り込みによる蛍光のドットが観察された。一方、21B2-TF結合リポソームを反応させた細胞では、細胞内にTFリポソームよりも明らかに多数の蛍光ドットが確認された。

実施例2

抗体、及び/またはトランスフェリンを結合後、さらにそのリポソーム反応液に分子量6000のPEGを用い作製したチオール化ポリエチレングリコール (特開平4-346918号公報)を脂質10mgに対して0.2μmol添加し10℃で一夜反応すること以外は実施例1と同様にして抗体及び/またはトランスフェリンに加えPEGを結合したリポソームを作製した。

ヒト胃癌細胞株MKN45を部分的にパイルアップするまで8ウェルチャンバースライド中で培養し、脂質濃度として1mg/mlのPEG修飾21B2-TFリポソーム、PEG修飾21B2リポソーム、PEG修飾TFリポソームとそれぞれ遮光下氷冷で1時間反応させた。反応終了後リポソーム液を洗浄除去し、10% (v/v) FBSを添加したメEDIUMに置換して37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、氷冷したPBS-Azで細胞を洗浄し、リポ

ソームが細胞内外のどちらに存在するかをより明確にするために、半数のウェルについて細胞を0.2 Mグリシン塩酸緩衝液 (pH 2.8) に室温で1分間浸すことを3回行い、細胞表面に結合したものを除去した。細胞を洗浄後風乾し、励起波長490 nmにおける504 nmの蛍光を観察した。

その結果、PEG修飾21B2リボソームを反応させた細胞では、細胞表面や外周に大部分の蛍光が観察され、この蛍光は細胞を0.2 Mグリシン塩酸緩衝液で洗浄することによってほとんど消失した (第3図a b)。PEG修飾TFリボソームを反応させた細胞ではごく弱いながらも細胞内にリボソームの凝集によるドットが観察され、細胞を0.2 Mグリシン塩酸緩衝液で洗浄しても大きな変化は見られなかった (第3図e f)。一方、21B2-TF結合リボソームを反応させた細胞では、細胞内にTFリボソームよりも明らかに多数のドットが確認され、細胞を0.2 Mグリシン塩酸緩衝液で洗浄しても大きな変化は見られなかった (第3図c d)。

したがって、細胞表面抗原CEAに対する抗体である21B2のみを結合したリボソームは、MKN 45の細胞表面に結合することはできるが、細胞内に取り込まれることは少なく、大部分が膜上にとどまることが示された。一方、TFリボソームはMKN 45に作用して細胞内に取り込まれるが、その量はわずかでしかないことが示された。これらに対して21B2-TF結合リボソームは、TFリボソームよりも明らかに多量のリボソームが細胞内に取り込まれており、21B2抗体のターゲッティング効果とTFのインターナライズ効果が相乗的に機能したと考えられた。

実施例 3

実施例1及び実施例2で示したPEG修飾及び非修飾のTFリボソーム及び21B2-TFリボソームを用いて、ヒト骨芽細胞系腫瘍細胞株K562への各リボソームの反応性を測定した。尚、TF及び21B2のリボソームへの結合量はPEG有無に関わらず同等であった。

ヒト骨芽細胞系腫瘍細胞株K562 (TF受容体高発現、CEA弱発現: FACScanで確認済み) を1.5 mlチューブに取り、脂質濃度として1 mg/mlの21B2-TFリボソーム、PEG修飾21B2-TFリボソーム、TF

リボソーム、PEG修飾TFリボソームとそれぞれ遮光下氷冷で1時間反応させた。反応終了後、細胞をPBS-Azで洗浄し、ボアサイズ35 μ mのフィルターを通してFACSscanによる解析に用いた。

その結果（第4図）、TFのみを結合したリボソームを反応させた細胞では、PEG修飾によって細胞当たりのリボソーム結合量が大きく減少した。一方、21B2及びTFを結合したリボソームを反応させた細胞では、PEG修飾によるリボソーム結合量の減少はわずかであった。

すなわちPEG修飾することでリボソームに直接結合したTFの結合活性を抑制する一方、PEGスペーサーの先端に結合した21B2抗体の結合活性にはほとんど影響を与えていないことが示された。このことはターゲットへの結合性がPEGスペーサーを介してリボソームに結合したリガンドの特異性をより反映することができる一方で、リボソームに直接結合したトランスフェリンによる反応性を抑制できることを示す。トランスフェリンは多くの正常細胞にも発現しており、このことは好ましくない非特異的反応を抑制しうることを示している。

実施例2に示すようにPEG修飾21B2-TFリボソームは良好な細胞への取り込み活性を維持することができることから、PEG修飾によりマスクされたトランスフェリンが抗体を介し細胞表面に保持されることでトランスフェリンの取り込み活性が局所で発揮されることが考えられる。

産業上の利用可能性

微粒子上にターゲット細胞に結合性のリガンド（A）に加えターゲット細胞への取り込み活性のあるリガンド（B）を付加することにより、リガンド（B）だけでは極めて取り込み能の低いターゲット細胞においても、両者のリガンドを付与することで高い細胞内取り込みが見いだされた。

また、微粒子にリガンドに結合性を有さない水溶性高分子（C）を結合することで、リガンド（B）による非特異的な反応を低減し、生体内での安定性の改善が期待される。

【図面の簡単な説明】

第1図は、細胞に結合性を有するリガンド（A）が水溶性高分子を介してリボソームに結合し、細胞に取り込まれる機能を有するリガンド（B）が直接リボソ

ームに結合した微粒子の概念図。

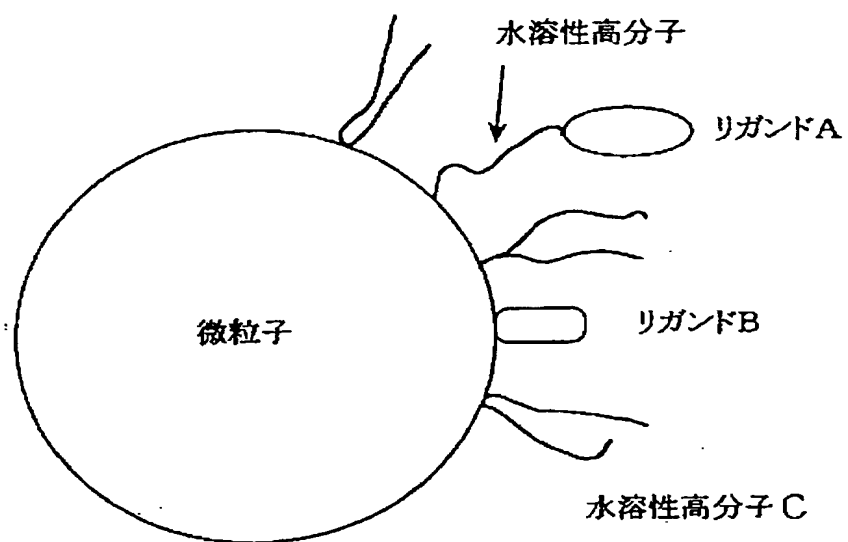
第2図は、ヒト胃癌細胞株MKN45細胞に各リボソームを、蛍光ラベルしたリボソームの蛍光像により示した写真である。MKN45細胞に各リボソームを氷冷下1時間反応し洗浄後、さらに37℃1時間反応させた時点での反応性を比較した。図中、aは21B2リボソームを、bは21B2-TFリボソームを、cはTFリボソームを反応させた後の蛍光像を示す。

第3図は、ヒト胃癌細胞株MKN45細胞に各リボソームの反応性及び各リボソームの内在化特性を、蛍光観察により比較した結果（写真）である。細胞にリボソームを氷冷下1時間反応し洗浄後、さらに37℃1時間反応させた時点での蛍光観察像、並びにさらに酸性緩衝液で洗浄することで細胞表面に結合したリボソームを除去し、細胞内に移行したリボソームを蛍光観察した像を示す。図中、aは21B2リボソーム（酸性緩衝液非洗浄）、bは21B2リボソーム（酸性緩衝液洗浄後）、cは21B2-TFリボソーム（酸性緩衝液非洗浄）、dは21B2-TFリボソーム（酸性緩衝液洗浄後）、eはTFリボソーム（酸性緩衝液非洗浄）、fはTFリボソーム（酸性緩衝液洗浄後）を示す。

第4図は、ヒト骨芽細胞系腫瘍細胞株K562への各リボソームの反応性を表すフローサイトメーター測定結果を表す図。図中縦軸はフローサイトメーターの蛍光シフト（細胞に結合したリボソーム量）ヒストグラムの平均値を示す。negative a はリボソームと反応させていない細胞のみの値を、TF-はPEG非修飾TFリボソームを、TF+はPEG修飾TFリボソームを、21B2TF-はPEG非修飾21B2-TFリボソームを、21B2TF+はPEG修飾21B2-TFリボソームを示す。

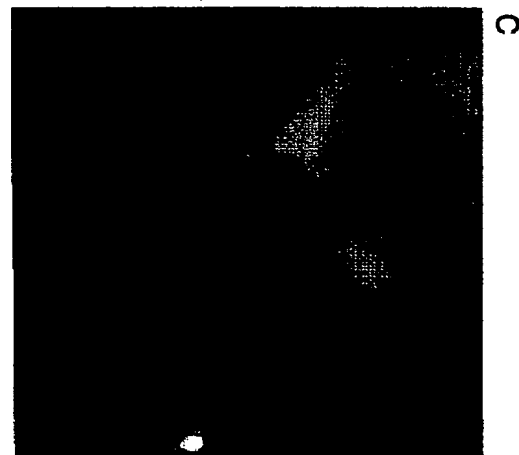
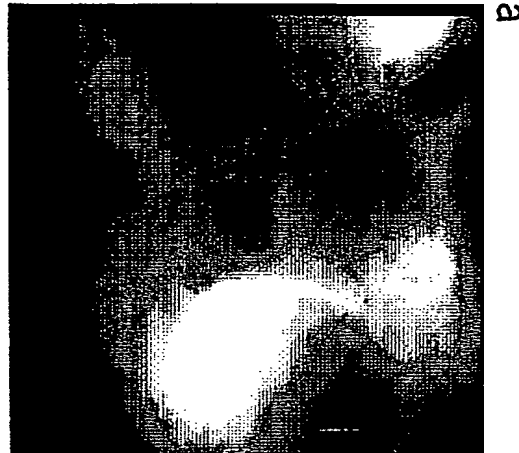
【図1】

第 1 図

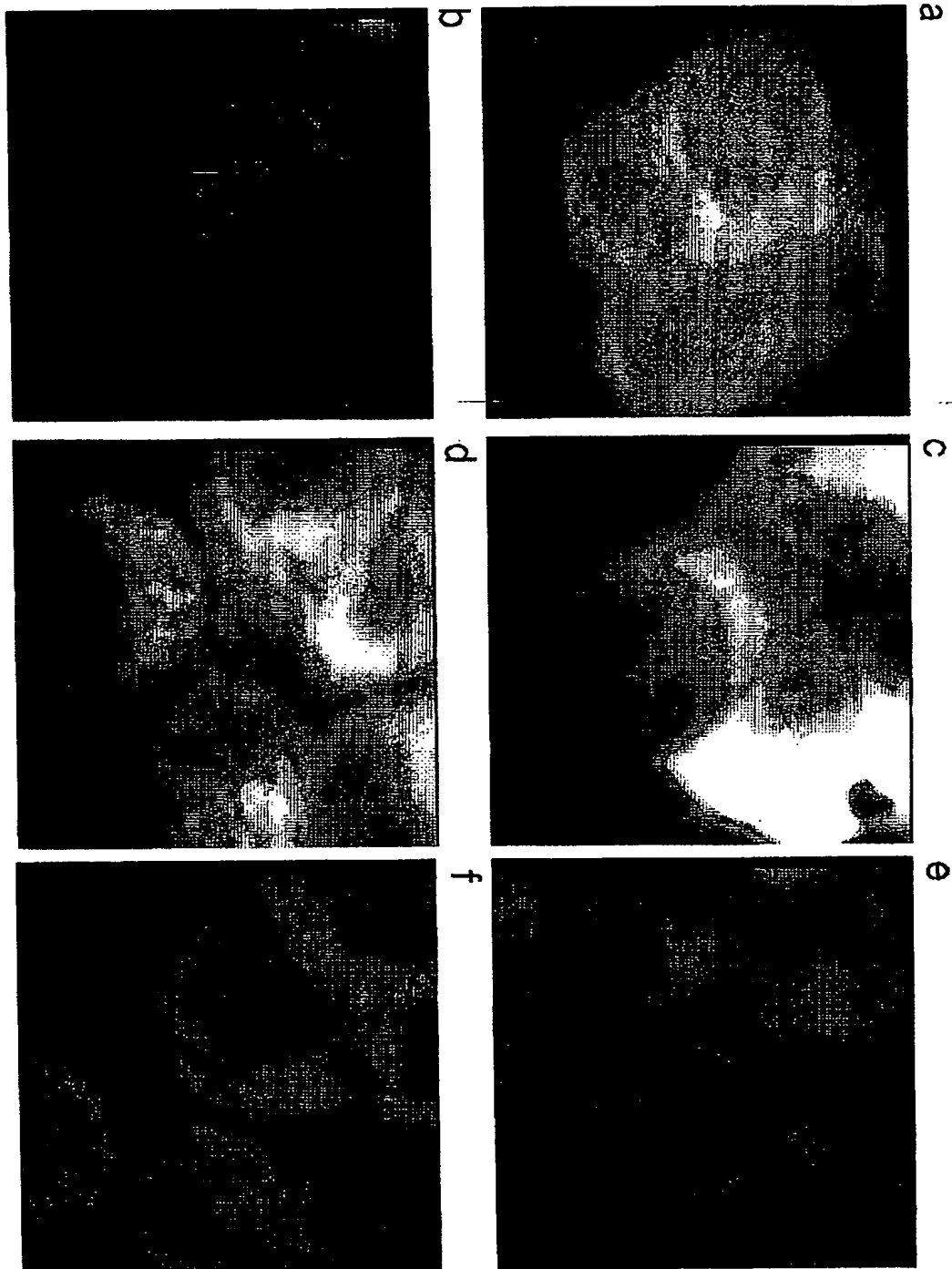


【図2】

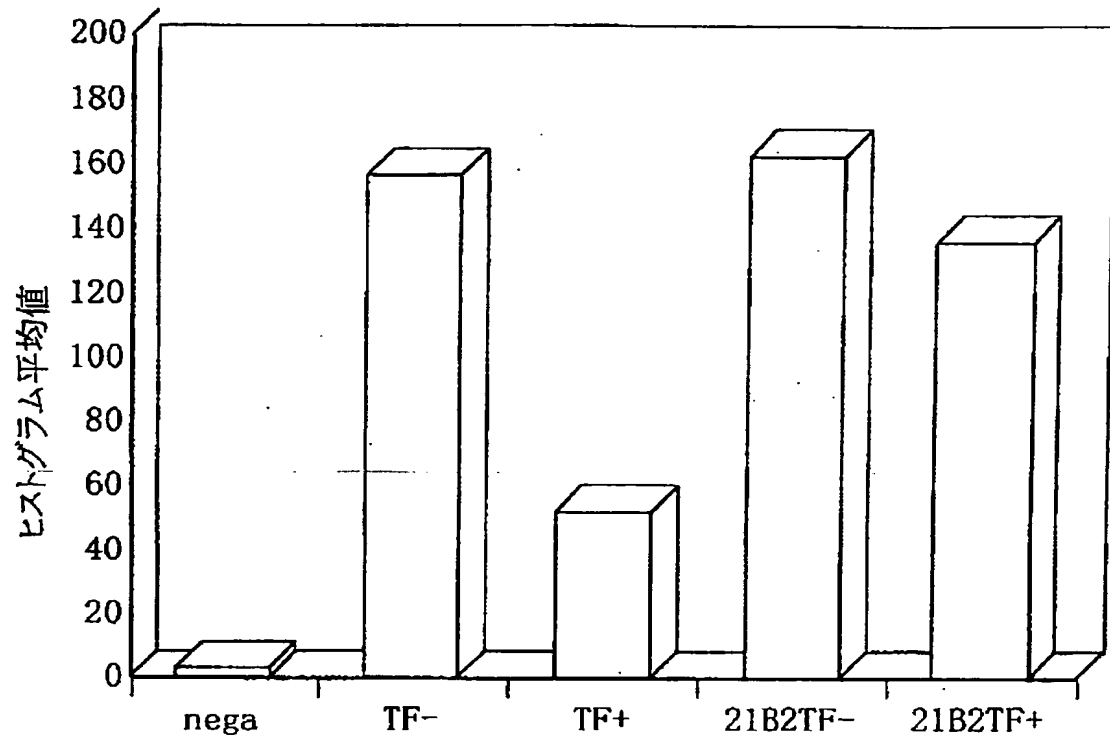
第2図



【図3】
第3図



【図4】
第4図



【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO0/02272
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. 7 A61K9/127, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. 7 A61K9/127, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 520499, A (Mitsubishi Kasei Corp.) 30. 12月. 1992 (30. 12. 92) & JP, 5-304987, A	1-11
A	JP, 9-110722, A (東レ株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) (ファミリーなし)	1-11
A	Biochemistry, 36, (1), 66-75 (1997)	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	27. 06. 00	国際調査報告の発送日 04.07.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 横尾 俊一 電話番号 03-3581-1101 内線 3490	4P 9840 印

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02272

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1は、「2種のリガンド」を、それぞれ、「特定の細胞に結合性を有するリガンド」及び「特定の細胞に取り込まれる機能を有するリガンド」と機能により限定している。しかし、「特定の細胞」に対して、いかなる「リガンド」が上記要件を満たすか不明である。したがって、実施例の範囲について国際調査を行った。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

フロントページの続き

(72)発明者 斎所 知子

日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000

番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所
内

(72)発明者 丸山 一雄

日本国神奈川県相模原市相原五丁目15-12

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項（実用新案法第48条の13第2項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.